

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C07B 61/00, G06F 15/40, 17/50, 17/30, C07K 1/00		A1	(11) 国際公開番号 WO99/01409
			(43) 国際公開日 1999年1月14日(14.01.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/02986		(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) 国際出願日 1998年7月2日(02.07.98)			
(30) 優先権データ 特願平9/177933 1997年7月3日(03.07.97) JP			
(71) 出願人 ; および (72) 発明者 板井昭子(ITAI, Akiko)[JP/JP] 〒113-0033 東京都文京区本郷5-16-6 Tokyo, (JP)			
(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 今村正純(IMAMURA, Masazumi)[JP/JP] 〒267-0066 千葉県千葉市緑区あすみが丘4丁目39番地 ガーデンコート杜の街五番館301号 Chiba, (JP)			
(74) 代理人 弁理士 今村正純, 外(IMAMURA, Masazumi et al.) 〒104-0031 東京都中央区京橋1丁目5番5号 KRFビル5階 Tokyo, (JP)		添付公開書類 国際調査報告書	
(54)Title: METHOD FOR INFERRING PROTEIN FUNCTIONS WITH THE USE OF LIGAND DATA BASE			
(54)発明の名称 リガンドデータベースを用いた蛋白質の機能推定法			
(57) Abstract A method for inferring the biological functions of a protein in question having a known or inferable configuration with the use of a three-dimensional structure data base containing physiologically active compounds capable of binding to target proteins with known biological functions, involving (1) the step of extracting from the data base as a ligand candidate a physiologically active compound capable of binding to the protein in question based on the capability of the physiologically active compound of forming a complex with the protein in question and (2) the step of inferring that the biological functions of the protein in question are identical with or similar to those of the target protein to which the above ligand candidate binds.			

Best Available Copy

(57)要約

生物学的機能がすでに知られている標的蛋白質に対して結合する生理活性化合物を格納した3次元構造データベースを用いて立体構造が既知または推定可能な質問蛋白質の生物学的機能を推定する方法であって、(1) 質問蛋白質と生理活性化合物との間の複合体形成能に基づいて該質問蛋白質に結合可能な生理活性化合物をリガンド候補として該データベースから抽出する工程；及び(2) 質問蛋白質の生物学的機能が該リガンド候補が結合する標的蛋白質の生物学的機能と同一又は類似であると推定する工程を含む方法。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	CH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CM	カメルーン	IT	イタリア	NO	ノルウェー		
CN	中国	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェッコ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国	RU	ロシア		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		

WO 99/01409

PCT/JP98/02986

明 細 書

リガンドデータベースを用いた蛋白質の機能推定法

技術分野

本発明は、蛋白質の機能推定方法及び該方法に用いるデータベースに関するものである。

背景技術

蛋白質は20種のアミノ酸をビルディングブロックとする生体高分子であり、ペプチド結合(-CONH-)により50~1,000個程度のアミノ酸が鎖状に結合した構造を有している。生体内の物質変換を触媒する酵素、細胞内外の情報伝達に関わる受容体、遺伝子発現の制御に関わる受容体、炎症時に分泌されるサイトカインや物質の輸送に関わる蛋白など、多様な蛋白質の存在が明らかにされている。ヒトなどの高等動物の生体内には5万から10万種類の蛋白質があり、それぞれ固有の機能と役割を担っているものと考えられている。

酵素は、特定の基質に作用して特定の生成物が得られるような化学反応の場を提供しており、緩和な条件で立体特異的または位置特異的な反応を進行させる。受容体は、ホルモンやシグナル伝達物質の結合による構造変化を通してシグナルを伝達する。これらの酵素や受容体に共通する特徴は、特定の分子(リガンド)との間で安定複合体を形成してその生物学的機能を発現することである。紐のように長い蛋白質分子は折り畳まれて一定の立体構造をとり、薬物などの人工分子や特定の生体分子と特異的に結合する構造部位(リガンド結合部位)を形成している。このリガンド結合部位は酵素や受容体の機能の発現に必須である。

蛋白質の立体構造は、X線結晶構造解析やn m r 解析により決定することができる。これらの解析技術のめざましい進歩と普及によって蛋白質の立体構造の決定は容易になっており、解析される蛋白質数は加速度的に増加している。蛋白質

WO 99/01409

PCT/JP98/02986

構造のデータベースであるプロテインデータバンクには、現在約 7,000 個を超える蛋白質の三次元座標が収められており、これらのデータは世界中で利用可能である。従って、蛋白質の機能が既知であれば、適切なリガンドとの複合体の結晶構造を解析することによって、その蛋白質の構造と機能の関係を原子レベルで理解することが可能になった。また、すでに結晶解析された蛋白質の立体構造を鋳型として用い、そのアミノ酸側鎖を置換することによって、相同性の高いアミノ酸配列を有する蛋白質の立体構造を推定すること（ホモロジーモデリング）も可能になった。

従来、蛋白質の研究は、その生物学的機能を目印にして蛋白質を分離・精製した後、そのアミノ酸配列を決定して構造や機能を解析する手法で行われていた。もともと、最近では、遺伝子の解析が容易になった結果、遺伝情報から蛋白質の存在が示唆されることも多い。例えば、ヒトのゲノム解析を目的とした大規模プロジェクトによって相当数の蛋白質の存在が明らかにされており、その成果は病因の解明や医薬創製に利用できるものと期待されている。

しかしながら、ゲノム解析研究からつぎつぎに見出される蛋白質については、単にそれらのアミノ酸配列が解明されるにとどまっており、ほとんどの場合、その生理機能は全く推定できない。このため、それぞれの蛋白質について機能を推定ないし確定するための膨大な研究が必要になっており、ゲノム情報の有効利用の障害となっている。また、アミノ酸配列が解明された蛋白質の立体構造は、結晶解析法や n m r 法の発達によって以前よりも容易に決定できるようになっているものの、立体構造が解明された蛋白質といえどもその機能は容易にわからないことが多い。

現在のところ、新規の蛋白質の機能を簡便に推定する方法は確立されていない。例えば、新規蛋白質のアミノ酸配列を機能既知の蛋白質のアミノ酸配列群と比較して、相同性の高い蛋白質が見出される場合には、その蛋白質と類似の機能を有するものと推定する方法が採用されている。また、同一機能の複数の蛋白質については、できる限り相同な部分が多くなるようにアラインメントすることによっ

WO 99/01409

PCT/JP98/02986

て構造と機能の相関についての情報は得られる。しかしながら、一般的には、機能が同一の蛋白質についてさえも生物種が異なると相同性はさほど高くないので、機能が同一か否か不明の多数の蛋白質に対しては上記のようなアラインメントに頼る手法は全く役に立たない。

発明の開示

本発明の課題は、蛋白質の機能を推定する方法を提供することにある。より具体的に言うと、本発明の課題は、立体構造が既知または推定可能な蛋白質の生体内での機能や役割を簡便に推定する方法を提供することにある。また、本発明の別の課題は、生理活性化合物（リガンド）の側から蛋白質のリガンド結合部位の形状及び性質を探索するために有用なデータベースを提供することにある。

本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意努力した結果、生物学的機能がすでに解明されている標的蛋白質に対してリガンドとして結合可能な生理活性化合物を格納した3次元構造データベースを予め作成しておき、機能未知の蛋白質とデータベース中のそれぞれの生理活性化合物との間での複合体の形成能を求め、複合体の形成能の高い生理活性化合物をリガンド候補として選択することにより、機能未知の蛋白質の機能を精度よく推定できることを見出した。本発明はこれらの知見を基にして完成されたものである。

すなわち本発明は、生物学的機能がすでに知られている標的蛋白質に対して結合する1又は2以上の生理活性化合物を格納した3次元構造データベースを用いて、立体構造が既知または推定可能な質問蛋白質の生物学的機能を推定する方法であって、下記の工程：

- (1) 質問蛋白質と生理活性化合物との間の複合体形成能に基づいて該質問蛋白質に結合可能な生理活性化合物をリガンド候補として該データベースから抽出する工程；及び
- (2) 質問蛋白質の生物学的機能が該リガンド候補が結合する標的蛋白質の生物学的機能と同一又は類似であると推定する工程

WO 99/01409

PCT/JP98/02986

を含む方法を提供するものである。

本発明の好ましい態様によれば、上記方法は以下の工程：

- (3) 質問蛋白質について1又は2以上のリガンド結合部位を抽出する工程；
 - (4) データベース中に含まれる各生理活性化合物について、質問蛋白質のリガンド結合部位との間で形成される最安定な複合体を探索する工程；
 - (5) 最安定複合体の安定性と構造上の特徴とに基づいて予め定めたヒットの条件を満足する生理活性化合物を抽出する工程；
 - (6) 必要に応じて、工程(5)で抽出された生理活性化合物のなかから上記工程(5)とは異なるヒットの条件を満足する生理活性化合物をさらに抽出する工程；及び
 - (7) 上記工程(5)または(6)で抽出された複合体を形成する生理活性化合物をリガンド候補として、質問蛋白質の生物学的機能が該リガンド候補が結合する標的蛋白質の生物学的機能と同一又は類似であると推定する工程；
- を含んでいる。

本発明のさらに好ましい方法では、上記の工程(4)ないし(6)はプログラム ADAM&EVE (PCT/JP95/02219: WO96/13785)を用いて自動的に行なわれる。本発明の別の態様によれば、生物学的機能がすでに知られている標的蛋白質に対して結合する1又は2以上の生理活性化合物を格納した3次元構造データベースを用いて該質問蛋白質の生物学的機能を推定する方法；生物学的機能がすでに知られている標的蛋白質に対して結合する3次元構造データベースに格納された1又は2以上の生理活性化合物を用いて質問蛋白質のリガンド結合部位の形状及び性質を探索することにより該質問蛋白質の生物学的機能を推定する方法；並びに、生物学的機能がすでに知られている標的蛋白質に対して結合する1又は2以上の生理活性化合物を格納した3次元構造データベースから質問蛋白質のリガンド候補を抽出して該質問蛋白質の機能を推定する方法が提供される。

本発明のさらに別の態様によれば、上記各方法に用いるデータベースであって、生物学的機能がすでに知られている標的蛋白質に対して結合する1又は2以上の生理活性化合物を格納した3次元構造データベースが提供される。この発明の好

WO 99/01409

PCT/JP98/02986

ましい態様によれば、各生理活性化合物についての標的蛋白質の情報を含むデータベースが提供され、さらに好ましい態様では、上記のデータベースは、上記方法の工程(4)ないし(6)をプログラム ADAM&EVE を用いて自動的に行うことができるような形式（本明細書において「ADAM 仕様データベース」と呼ぶ場合がある）で作成されている。

別の観点からは、本発明により、標的蛋白質は知られていないが生体内での生理活性が知られている 1 又は 2 以上の内因性の生理活性化合物を格納した 3 次元構造データベースを用いて、立体構造が既知又は推定可能な質問蛋白質の生物学的機能を推定する方法であって、下記の工程：

(1) 質問蛋白質と生理活性化合物との間の複合体形成能に基づいて該質問蛋白質に結合可能な生理活性化合物をリガンド候補として該データベースから抽出する工程；及び

(8) 質問蛋白質の生物学的機能が該リガンドの生理活性に関与するものであると推定する工程

を含む方法が提供される。

この方法の好ましい態様によれば、下記の工程：

(3) 質問蛋白質について 1 又は 2 以上のリガンド結合部位を抽出する工程；

(4) データベース中に含まれる各生理活性化合物について、質問蛋白質のリガンド結合部位との間で形成される最安定な複合体を探索する工程；

(5) 最安定複合体の安定性と構造上の特徴とに基づいて予め定めたヒットの条件を満足する生理活性化合物を抽出する工程；

(6) 必要に応じて、工程(5)で抽出された生理活性化合物のなかから上記工程(5)とは異なるヒットの条件を満足する生理活性化合物をさらに抽出する工程；及び

(9) 工程(5)又は(6)で抽出された複合体を形成する生理活性化合物をリガンド候補として、質問蛋白質の生物学的機能が該リガンドの生理活性に関与するものであると推定する工程を含む上記の方法が提供される。さらに好ましい態様では、上記工程(4)ないし(6)をプログラム ADAM&EVE を用いて自動的に行う上記方法が

WO 99/01409

PCT/JP98/02986

提供される。

また、本発明により、標的蛋白質は知られていないが生体内での生理活性が知られている 1 又は 2 以上の内因性の生理活性化合物を格納した 3 次元構造データベースを用いて、立体構造が既知又は推定可能な質問蛋白質の生物学的機能を推定する方法；標的蛋白質は知られていないが生体内での生理活性が知られている 3 次元構造データベースに格納された 1 又は 2 以上の内因性の生理活性化合物を用いて、質問蛋白質のリガンド結合部位の形状及び性質を探索することにより該質問蛋白質の生物学的機能を推定する方法；標的蛋白質は知られていないが生体内での生理活性が知られている 1 又は 2 以上の内因性の生理活性化合物を格納した 3 次元構造データベースから質問蛋白質のリガンド候補を抽出して該質問蛋白質の生物学的機能を推定する方法も提供される。

さらに、上記の方法に用いるデータベースであって、標的蛋白質は知られていないが生体内での生理活性が知られている 1 又は 2 以上の内因性の生理活性化合物を格納した 3 次元構造データベースが本発明により提供される。この発明の好ましい態様によれば、各生理活性化合物についての生理活性情報を含むデータベースが提供され、さらに好ましい態様では、上記のデータベースは上記方法の工程(4)ないし(6)をプログラム ADAM&EVE を用いて自動的に行うことができるような形式で作成されている。

図面の簡単な説明

第 1 図は、実施例で用いたウシ・トリプシンの三次元構造とリガンド結合部位を示した図である。

第 2 図は、リガンド候補としてデータベースから抽出されたナファモスタットが質問蛋白質のリガンド結合部位に結合する様式を示した図である。

発明を実施するための最良の形態

〔データベースの作成〕

WO 99/01409

PCT/JP98/02986

本発明の方法を実施するにあたっては、生物学的機能がすでに知られている標的蛋白質に対してリガンドとして結合する生理活性化合物を格納した3次元構造データベースを予め作成しておくことが好ましい。生理活性化合物の種類は特に限定されないが、例えば、生体内に存在している種々の生理活性物質、例えば、伝達物質（受容体基質）、酵素基質及び酵素生成物、ビタミン、ホルモン、オートコイド、補酵素、アミノ酸、生理活性ペプチド、ヌクレオチド、解糖系の単糖類、または有機酸などのほか、医薬分子、酵素阻害剤、または毒素など本来的に生体内に存在しない分子であってもよい。また、低分子物質に限らず、蛋白質、RNAまたはDNAなどの核酸、又は多糖類などの高分子化合物であってもよい。

本発明の方法の推定精度を高めるためには、上記データベース中には多様な生物学的機能を網羅するように多数の生理活性化合物が格納されていることが望ましい。また、データベースには一つの生理活性について少なくとも1個の代表的な生理活性化合物が格納されていればよいが、同一の生理活性について多様な分子骨格の生理活性化合物がなるべく数多く格納されていることが望ましい。さらに、適宜のデータベースを2種以上作成しておき、それらのうちから所望のデータベースを選択して本発明の方法に用いてもよい。

データベース中に格納されるそれぞれの生理活性化合物については、化合物の構造に関する情報；標的蛋白質との結合に関する情報；標的蛋白質の生物学的機能に関する情報；標的蛋白質が未知の場合には化合物の生理活性に関する情報などが付加されていることが望ましい。このような情報として、例えば、下記の群：化合物名；構成原子数及び分子量；各原子の元素名；二次元座標及び三次元座標；力場計算用原子タイプ；原子電荷；結合関係；モデリング法；コンフォメーション；役割；生理活性；標的蛋白質名；サブユニット又はドメイン；機能分類；生物種；結合定数又はサブタイプ特異性；及び立体構造情報から選ばれる1又は2以上の情報を挙げることができる。

本発明のデータベースではこれらのすべてが情報として付加されていることが好ましい。もっとも、生理活性物質についての情報は上記のものに限定されるこ

WO 99/01409

PCT/JP98/02986

とはなく、これらのうちの1個又は2個以上が他の情報で置き換えられていてもよい。さらに、必要に応じて上記の情報に他の情報が追加されていてもよい。また、これらの情報については、必ずしも単一のデータベースに格納されていなくてもよく、各データベースのレコードあるいはデータを示すタグ情報などをデータに含めることなどによって、なんらかの連携がとられていればよい。以下、各情報についてより具体的に説明するが、これらは一例として説明するものであり、当業者が適宜選択可能であることはいうまでもない。

「化合物名」としては、慣用名、商品名、開発コード、IUPACによる命名など生理活性化合物を特定できるものであればいかなるものを用いてもよい。「構成原子数」は生理活性化合物に含まれる構成元素毎の含まれる数であり、例えば、 $C_{24}H_{20}O_2$ のように表される。「三次元座標」はオングストローム単位の直交軸(x, y, z)で表現されているものが好適である。「力場計算用原子タイプ」とは、力場エネルギーを計算するために、軌道の混成状態などによって元素をさらに細かく分類した記号や番号のことである。「原子電荷」とは、力場エネルギーのうち静電相互作用エネルギーを計算するために設定される各原子上の形式電荷のことであり、「結合関係」とは、分子中の何番目の原子と何番目の原子が共有結合しているか、及びそれらが何重結合かを示す情報のことである。

「モデリング法」は、生理活性化合物の3次元構造の由来を示す情報であり、単独の結晶構造に由来する3次元構造であるか、または3次元化プログラムを用いて2次元構造から推定した3次元構造であるかなどの情報を含んでいる。「コンフォメーション」は、3次元構造のコンフォメーションが3次元化により得られた局所安定構造のうちの1つであるか、又は単独の結晶構造か若しくはn m rにより決定されたもののいずれであるかという情報と、そのコンフォメーションが活性コンフォメーションであるか否かなどの情報を含んでいる。「役割」とは、標的蛋白質に対して、生理活性化合物が酵素基質、酵素反応生成物、酵素阻害剤、補酵素、エフェクター、生体内リガンド、アゴニスト、アンタゴニスト、受容体基質などのいずれに該当するのかわかることを示す情報である。「生理活性」は、その生理

WO 99/01409

PCT/JP98/02986

活性化化合物が与えられることによって生体が惹起する変化についての情報である。

「標的蛋白質名」としては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素、レチノイド受容体など、一般的に蛋白質の機能を含んだ名称として用いられているものを採用することが好ましい。「サブユニットまたはドメイン」とは、標的蛋白質が複数のサブユニットまたはドメインからなる場合に生理活性化化合物が結合するサブユニットまたはドメインを示す情報である。「機能分類」とは、標的蛋白質が生体内ではたしている機能の大まかな分類のことであり、例えば、酵素、膜貫通型受容体、核内受容体、サイトカイン、輸送蛋白質などの分類を含む情報である。

「生物種」の情報には、標的蛋白質がどの生物種に由来するのかに関する情報を含める。種、属、科、綱などの分類によるが、より実用的に、例えば、あらゆる生物種ならば1、高等動物ならば2、下等動物ならば3、原核生物ならば4、植物ならば5のような分類でもよい。「組織」は、標的蛋白質が主として存在して機能している組織の情報を含んでいればよく、生物種がヒトの場合には、例えば、血液、肝臓などの組織名を与えることができる。「結合定数とサブタイプ特異性」には、結合定数、 IC_{50} 、結合のサブタイプ特異性などの情報を含めておけばよい。「立体構造」の情報には標的蛋白質の3次元構造が既知か否かの情報が含まれており、3次元構造が既知の場合にはその解析手法が結晶解析かnmr解析のいずれであるかについての情報と、プロテインデータベースから利用できる場合にはそのコード番号を含めておくことが望ましい。

〔質問蛋白質についてのリガンド結合部位の抽出〕

生物学的機能を推定する質問蛋白質は、立体構造が既知であるかまたは推定可能であれば、その種類や大きさは特に限定されない。例えば、複数のサブユニットからなる蛋白質であってもよいし、糖蛋白質などの複合蛋白質であってもよい。質問蛋白質について結晶解析やnmrによる三次元構造解析がなされている場合には、立体構造のデータをそのまま用いることができる。また、類似蛋白質についての立体構造を鋳型として、ホモロジーモデリング手法などによって立体構造

WO 99/01409

PCT/JP98/02986

を推定してもよい。

質問蛋白質とデータベース中の生理活性化合物との間での複合体の形成能を判定するために、質問蛋白質分子に存在するリガンド結合部位の候補を1又は2個所以上抽出する。この工程は、一般的には、コンピュータグラフィックス画面上に描いた質問蛋白質の分子を回転させながら、リガンド結合部位となりうる分子表面の窪みや穴など特徴的な形態や性質を有する部位の大きさや深さなどを視覚的に判断しながら対話的に行えばよいが、これらの部位を自動探索させることも可能である。質問蛋白質の分子表面に2ヶ以上の候補部位が見出された場合には、それぞれをリガンド結合部位として以下の探索工程を行えばよい。

〔生理活性化合物と質問蛋白質との間で形成される安定複合体の探索〕

質問蛋白質に見出された1又は2以上のリガンド結合部位とデータベースに格納された各生理活性化合物との間で複合体の形成能の判定を行う。複合体の形成能は、例えば、データベースに格納された生理活性化合物の一つを質問蛋白質上のリガンド結合部位に結合させて1又は2以上の複合体を作出した後、その複合体の安定性（エネルギーの低さなど）及び構造上の特徴に基づいて判定することができる。生理活性化合物と質問蛋白質のリガンド結合部位との間で形成される複数の安定複合体を効率よく探索するためには、ドッキングスタディとよばれるシミュレーションを利用することができる。

この方法は、一般的にはコンピュータグラフィックス画面上に構造既知の蛋白質のリガンド結合部位を表示し、結合すべき分子を回転並進させて安定に結合しそうな位置関係を探す工程を含んでおり、通常は対話的に行うことができる。回転可能な結合をもつ配座がフレキシブルな分子については配座を変化させながら安定位置を探す工程を含めることが好ましい。安定な結合を与えそうな位置関係をいくつか求め、適宜エネルギー計算や最適化計算を行って最も安定な複合体構造を推定することが可能である。

ドッキングスタディのためのプログラムとしては、例えば、富岡らが開発した

WO 99/01409

PCT/JP98/02986

プログラム (GREEN) を好適に用いることができる (Tomiooka, N. and Itai, A., J. Comput.-Aided Mol. Design, 8, pp. 347-366, 1994)。もっとも、分子の回転並進に関する自由度と配座の自由度は相互にカップルしているために、組み合わせ的にすべての可能性を網羅して最も安定な構造を推定するためには、上記の対話的方法では不十分な場合がある。このような問題を解決しつつ最安定な複合体構造を探索する方法として、ドッキングを自動的に行う水谷らのプログラム (ADAM) を好適に用いることができる (Mizutani, Y.M., et al., J. Mol. Biol., 243, pp. 310-326, 1994; US Patent No. 5,642,292; PCT/JP93/0365)。

プログラム ADAM を利用すると、結合様式とコンフォメーションの自由度から生じる膨大な数の複合体構造の中から、最安定な複合体構造を含む数個から数十個の安定複合体構造を効率よく探索することができ、探索結果として得られた複合体構造を安定性その他の指標の順にならべて自動的に出力することができる。プログラム ADAM は、水素結合形成の幾何学的条件から結合様式とリガンド配座の大まかな可能性を網羅したのち、エネルギー最小化を繰り返して位置関係とねじれ角を連続空間で構造最適化する工程を含んでおり、信頼性と精度が高いのが特徴である。

プログラム ADAM を用いて複合体構造を推定するには、一般的には、質問蛋白質と生理活性化合物の 3 次元座標のほか、生理活性化合物の各原子について力場エネルギー計算用の原子タイプ番号と原子電荷、ヘテロ原子についての水素結合性官能基の分類番号、配座生成用に回転可能結合についてのねじれ角の初期値、最終値、増分値などが必要になる。これらのパラメータは、プログラム ADAM を用いてデータベースに含まれる生理活性化合物を 1 個ずつ処理する際に、コンピュータグラフィックス画面上で対話的に入力することが可能である。

〔リガンド候補となる生理活性化合物の抽出〕

各生理活性化合物と質問蛋白質との間で形成される複合体の形成能を評価することによって、データベースに格納された生理活性化合物の中から、質問蛋白質

WO 99/01409

PCT/JP98/02986

に対してリガンドとして安定に結合可能な化合物をリガンド候補として抽出することができる。最も好ましい態様では、前記の複合体の探索工程とリガンド候補の抽出工程を、一連の工程としてプログラム ADAM&EVE (PCT/JP95/02219: W096/13785) により全自動的に行うことができる。

プログラム ADAM&EVE を用いると、データベースに含まれる多様かつ多数の生理活性化合物のそれぞれについて、質問蛋白質との間で形成される複合体のなかから最も安定な複合体（最安定複合体）だけが自動的に探索される。その後、その最安定複合体について予め定めた選別のための基準（ヒットの条件）を満たすか否かが判定され、基準を満足する 1 又は 2 個以上の最安定複合体を形成する生理活性化合物がリガンド候補として抽出される。ヒットの条件としては、一般的には、複合体の安定性（エネルギー値）と構造上の特徴に関するパラメータを採用することができる。例えば、分子間相互作用エネルギー値、水素結合数、分子量、原子数、環の数、蛋白質中の特定の官能基とのイオン結合や水素結合などを自由に設定することができる。

複合体の探索工程とリガンド候補の抽出工程をプログラム ADAM&EVE で行う場合には、データベースに含まれる多様かつ多数の生理活性化合物を自動的に処理できるように、質問蛋白質と生理活性化合物の 3 次元座標の他、水素原子の座標、生理活性化合物の各原子について力場エネルギー計算用の原子タイプ番号と原子電荷、ヘテロ原子についての水素結合性官能基の分類番号、配座生成用に用いる回転可能な結合とそれらの回転に関する情報（ねじれ角の初期値、最終値、増分値）などをデータベースに含めておくことが望ましい。これらの情報を含み、プログラム ADAM&EVE に適するデータベースは本発明の特に好ましい態様である。

生理活性化合物の各構成原子についての元素名、3 次元座標、及び結合関係の情報を含む通常の 3 次元構造データベースを利用して、プログラム ADAM&EVE に適する上記の好ましいデータベースを作成することができる（ADAM 仕様データベース）。ADAM 仕様データベースの作成方法は、例えば、PCT 国際公開 W096/13785 に詳細に記載されているので、その方法に従って、又は必要に応じて適宜の修飾

WO 99/01409

PCT/JP98/02986

や改変を施すことにより、当業者は容易にデータベースを作成することができる。例えば、通常の3次元構造データベースを読み込んだ後、上記の情報を自動的に割り振ることが可能である。なお、該データベースが水素原子の3次元座標の情報を含んでいない場合には、最安定複合体構造を正しく推定するために水素原子の予想位置を計算して自動的に付加する必要があるが、結合回転のために水素原子の位置が推定できない場合には、トランス型に伸びた位置に水素原子を置くことが望ましい。

データベースの作成及び上記の情報の追加を行う好ましい方法として、例えば、市販化合物や社内化合物の管理に標準的に用いられている MDL 社の ISIS プログラムを用いて化学構造を入力した後、同社 2 次元 Molfile 形式のデータベースを作成し、三次元化プログラムで 3 次元構造に自動変換し、さらに上記の情報を自動付加する方法を挙げることができる。もっとも、本発明のデータベースはこの方法に従って作成されたものに限定されることはない。

リガンド候補の抽出工程において適用されるヒットの条件を適宜選択することにより、抽出されるリガンド候補の数を調節することができる。リガンド候補の抽出を高速かつ精度よく行うためには、抽出工程を 2 段階以上の操作で行うことが好ましい。例えば、第一段階の抽出では比較的緩やかなヒットの条件を適用してリガンド候補となる可能性のある生理活性化合物を漏れなく抽出しておき、次段階の抽出において複合体のエネルギー、水素結合数、及びその他の情報に基づいて新たに厳しいヒットの条件を設定して、最終的に最も可能性の高い 1 又は 2 個以上の最安定複合体を選択することができる。

〔質問蛋白質の機能推定〕

ヒットの条件を満たした最安定複合体を構成する生理活性化合物（リガンド候補）は、質問蛋白質に対してリガンドとして安定に結合することが可能である。すなわち、質問蛋白質はリガンド候補が結合する標的蛋白質と同一又は構造類似のリガンド結合部位を有しており、従って、質問蛋白質と該標的蛋白質とは同一

WO 99/01409

PCT/JP98/02986

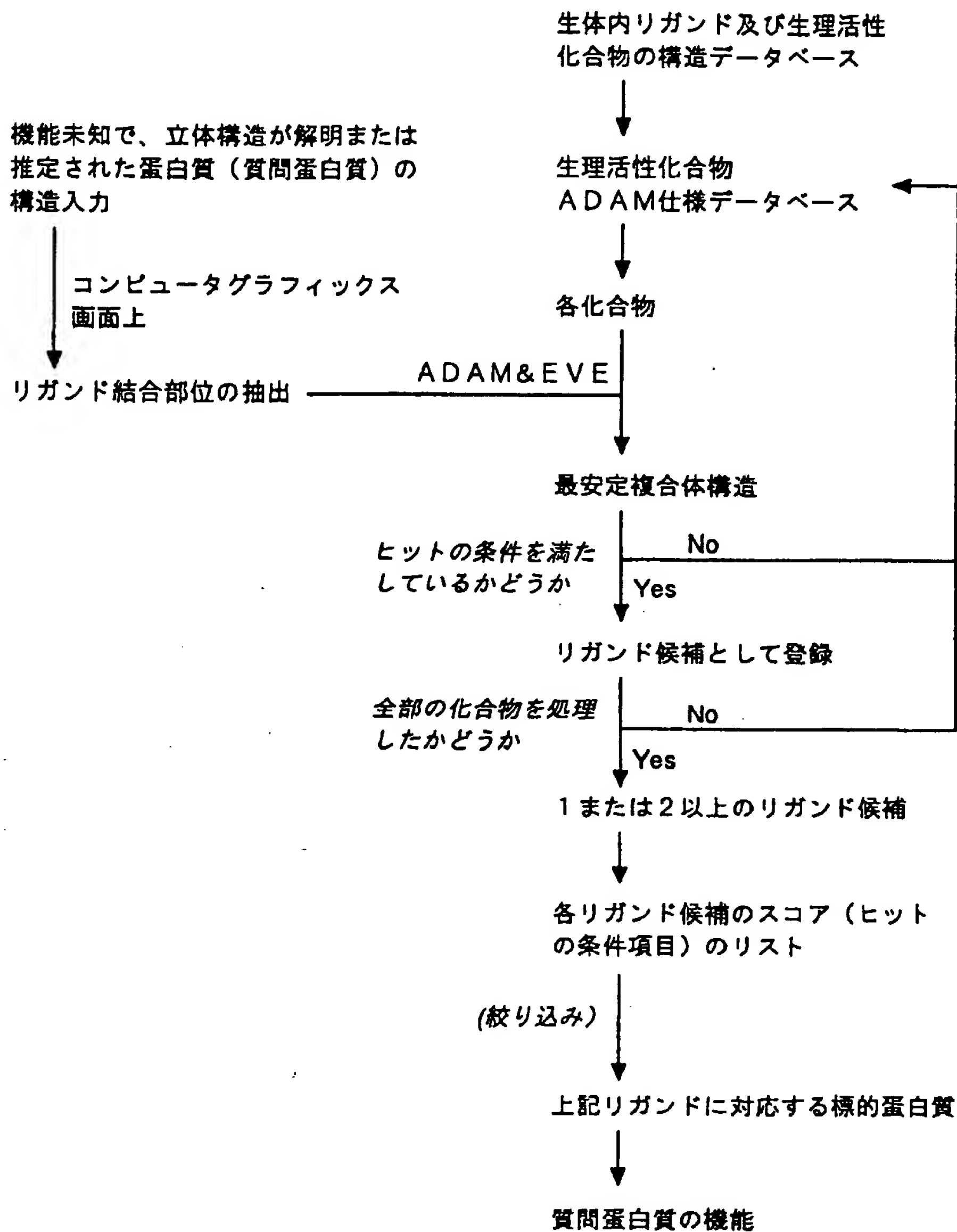
又は類似の生物学的機能を有している可能性が高い。また、質問蛋白質に対する該生理活性化合物の役割は、標的蛋白質に対する役割（例えば酵素基質、受容体基質などの役割）と同一又は類似であると推定できる。なお、抽出された化学構造の異なる複数のリガンド候補の標的蛋白質が同一のものである場合には、上記の推定結果は極めて信頼性が高い。

例えば、多様な生理活性化合物を含むデータベースの中からレチノイン酸がリガンド候補として抽出された場合には、質問蛋白質はレチノイド受容体としての機能を有しており、また、レチノイン酸は該質問蛋白質に対してアゴニスト又はアンタゴニストとしての役割を有していると推定できる。特定の標的蛋白質との同一性や類似性が推定できない場合であっても、質問蛋白質の機能が推定できる可能性もある。例えば、補酵素 NADPH のようにさまざまな生体高分子に結合することのできる生理活性化合物がリガンド候補として抽出された場合には、質問蛋白質は NADPH を補酵素として利用する酸化還元酵素あるいは NADPH によって調節を受ける酵素又は受容体のいずれかの機能を有すると推定できる。また、標的蛋白質は知られていないが生体内での生理活性が知られている内因性の生理活性化合物がリガンド候補として抽出された場合には、該質問蛋白質はその生理活性物質を生体内リガンドとする新規の受容体又は酵素である可能性がある。

本発明の推定方法の好ましい態様の一例として、プログラム ADAM&EVE を用いる具体的な作業手順を下記のスキームに示すが、本発明の方法は下記の方法に限定されることはない。

WO 99/01409

PCT/JP98/02986



上記のスキームに従って、各工程を説明する。

1. 生体内に存在する酵素基質、酵素生成物、補酵素、シグナル伝達物質、ホルモンなどの生体内リガンド化合物、及び標的蛋白質が既知の生理活性化合物を選び、化合物名、2次元構造、及びその他の情報を入力して本発明のデータベース

WO 99/01409

PCT/JP98/02986

を作成する。また、それぞれの生理活性化合物に対する標的蛋白質の情報を入力する。

2. 上記データベースの2次元構造を3次元構造に変換し、さらに必要なデータを自動的に付加してADAM仕様データベースを作成する。

3. 質問蛋白質の三次元構造を入力する。

4. コンピュータグラフィックス画面上で対話的に1又は2以上のリガンド結合部位（候補部位）を指定し、プログラム ADAM&EVE による計算に必要な3次元格子点、水素結合、ダミー原子などの情報を算出する。

5. ヒットの条件を設定する。

6. データベースから1個の生理活性化合物を選択する。

7. プログラム ADAM&EVE により、該生理活性化合物と質問蛋白質との間の最安定複合体構造を推定する。

8. 上記最安定複合体がヒットの条件を満たしているかどうかを判定する。

9. 条件を満たしている場合には、ヒットとして該生理活性化合物をリガンド候補群（一次抽出群）に加え、座標データその他を保存する。

10. 工程6に戻り、別の生理活性化合物の最安定複合体構造を推定し、未処理の生理活性化合物がなくなるまで工程6から工程9を繰り返す。

11. リガンド候補群（一次抽出群）に含まれる生理活性化合物について、その数、個々の複合体構造でのエネルギー値、水素結合数その他の情報を含むリストを出力する。

12. リガンド候補群に含まれる生理活性化合物を適正な数に絞り込む。絞り込みの方法としては、必要数を上位から選択する方法；ヒットの条件の基準値を変えて厳しく選択する方法；コンピュータグラフィックス画面上で対話的に選別する方法；異なる物理化学的性質や異なる計算法によってヒットの条件を設定して選択する方法などのいずれか、またはそれらの方法から選ばれる2以上の方法の適宜の組み合わせを採用する。

13. 最終的に少数のリガンド候補を抽出する。抽出された各リガンド候補の複合

WO 99/01409

PCT/JP98/02986

体構造をコンピュータグラフィックス画面上で観察することが望ましい。

14. 各リガンド候補の標的蛋白質の種類及び生物学的機能をデータベースから出力する。

15. 質問蛋白質の生物学的機能を1または2以上推定する。

実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

例1

表1に示す生理活性化合物を含む小規模なデータベースを作成し、データベースに含まれる生理活性化合物について三次元構造が既知の蛋白質への結合性を探索した。本発明の方法は、本来的には機能が未知の質問蛋白質に対して適用することができるが、本実施例ではウシ・トリプシンを機能未知の蛋白質と仮定して質問蛋白質として用い、トリプシン阻害剤である「ナファモスタット」がリガンド候補として選択されるか否かを検討した。ウシ・トリプシンの三次元構造とリガンド結合部位を図1に示す。

表1

生理活性化合物	標的生体高分子
メソトレキセート	ジヒドロ葉酸還元酵素
レチノイン酸	レチノイド受容体
ナファモスタット	トリプシン
インドメサシン	シクロオキシゲナーゼ
ドネペジル (E2020)	アセチルコリンエステラーゼ
フォルボールエステル	プロテインカイネースC
モルヒネ	オピオイド受容体
エストラジオール	エストロゲン受容体

WO 99/01409

PCT/JP98/02986

データベースの検索の結果、ナファモスタットがリガンド候補として抽出され、この化合物が質問蛋白質に安定に結合することが示された。ナファモスタットのリガンド結合部位への結合様式を図2に示す。インドメサシンは、かなり不安定ながら複合体を作る可能性があることが推定されたが、他の化合物はすべて複合体形成能がないと判定された（表2）。この検索結果から、質問蛋白質の機能はナファモスタットの標的蛋白質であるトリプシンと同一または類似であると推定された。

表 2

生理活性化合物	分子間相互 作用 (Kcal/mol)	分子間水素 結合数 (本)
メソトレキセート	NA	NA
レチノイン酸	NA	NA
ナファモスタット	-39.6	5
インドメサシン	-29.9	2
ドネペジル (E2020)	NA	NA
フォルボールエステル	NA	NA
モルヒネ	NA	NA
エストラジオール	NA	NA

NA: 安定な複合体構造が得られなかったもの

産業上の利用可能性

本発明の方法によれば、機能未知の蛋白質の機能を高速かつ高精度に推定できる。また、本発明のデータベースは上記の方法を効率よく行うために有用である。

WO 99/01409

PCT/JP98/02986

請 求 の 範 囲

1. 生物学的機能がすでに知られている標的蛋白質に対して結合する1又は2以上の生理活性化合物を格納した3次元構造データベースを用いて、立体構造が既知または推定可能な質問蛋白質の生物学的機能を推定する方法であって、下記の工程：

(1) 質問蛋白質と生理活性化合物との間の複合体形成能に基づいて該質問蛋白質に結合可能な生理活性化合物をリガンド候補として該データベースから抽出する工程；及び

(2) 質問蛋白質の生物学的機能が該リガンド候補が結合する標的蛋白質の生物学的機能と同一又は類似であると推定する工程を含む方法。

2. 以下の工程：

(3) 質問蛋白質について1又は2以上のリガンド結合部位を抽出する工程；

(4) データベース中に含まれる各生理活性化合物について、質問蛋白質のリガンド結合部位との間で形成される最安定な複合体を探索する工程；

(5) 最安定複合体の安定性と構造上の特徴とに基づいて予め定めたヒットの条件を満足する生理活性化合物を抽出する工程；

(6) 必要に応じて、工程(5)で抽出された生理活性化合物のなかから上記工程(5)とは異なるヒットの条件を満足する生理活性化合物をさらに抽出する工程；及び

(7) 上記工程(5)又は(6)で抽出された複合体を形成する生理活性化合物をリガンド候補として、質問蛋白質の生物学的機能が該リガンド候補が結合する標的蛋白質の生物学的機能と同一又は類似であると推定する工程；

を含む請求の範囲第1項に記載の方法。

3. 上記の工程(4)ないし(6)をプログラム ADAM&EVE を用いて自動的に行う請求の範囲第2項に記載の方法。

4. 生物学的機能がすでに知られている標的蛋白質に対して結合する1又は2以

WO 99/01409

PCT/JP98/02986

上の生理活性化合物を格納した 3 次元構造データベースを用いて蛋白質の生物学的機能を推定する方法。

5. 生物学的機能がすでに知られている標的蛋白質に対して結合する 3 次元構造データベースに格納された 1 又は 2 以上の生理活性化合物を用いて質問蛋白質のリガンド結合部位の形状及び性質を探索することにより蛋白質の生物学的機能を推定する方法。

6. 生物学的機能がすでに知られている標的蛋白質に対して結合する 1 又は 2 以上の生理活性化合物を格納した 3 次元構造データベースから質問蛋白質のリガンド候補を抽出して該質問蛋白質の機能を推定する方法。

7. 請求の範囲第 1 項ないし第 6 項のいずれか 1 項の方法に用いるデータベースであって、生物学的機能がすでに知られている標的蛋白質に対して結合する 1 又は 2 以上の生理活性化合物を格納した 3 次元構造データベース。

8. 各生理活性化合物についての標的蛋白質の情報を含む請求の範囲第 7 項に記載のデータベース。

9. 標的蛋白質は知られていないが生体内での生理活性が知られている 1 又は 2 以上の内因性の生理活性化合物を格納した 3 次元構造データベースを用いて、立体構造が既知又は推定可能な質問蛋白質の生物学的機能を推定する方法であって、下記の工程：

(1) 質問蛋白質と生理活性化合物との間の複合体形成能に基づいて該質問蛋白質に結合可能な生理活性化合物をリガンド候補として該データベースから抽出する工程；及び

(8) 質問蛋白質の生物学的機能が該リガンドの生理活性に関与するものであると推定する工程を含む方法。

10. 下記の工程：

(3) 質問蛋白質について 1 又は 2 以上のリガンド結合部位を抽出する工程；

(4) データベース中に含まれる各生理活性化合物について、質問蛋白質のリガン

WO 99/01409

PCT/JP98/02986

ト結合部位との間で形成される最安定な複合体を探索する工程；

(5) 最安定複合体の安定性と構造上の特徴とに基づいて予め定めたヒットの条件を満足する生理活性化合物を抽出する工程；

(6) 必要に応じて、工程(5)で抽出された生理活性化合物のなかから上記工程(5)とは異なるヒットの条件を満足する生理活性化合物をさらに抽出する工程；及び

(9) 工程(5)又は(6)で抽出された複合体を形成する生理活性化合物をリガンド候補として、質問蛋白質の生物学的機能が該リガンドの生理活性に関与するものであると推定する工程を含む請求項9に記載の方法。

1 1. 上記工程(4)ないし(6)をプログラム ADAM&EVE を用いて自動的に行う請求項10に記載の方法。

1 2. 標的蛋白質は知られていないが生体内での生理活性が知られている1又は2以上の内因性の生理活性化合物を格納した3次元構造データベースを用いて、立体構造が既知又は推定可能な質問蛋白質の生物学的機能を推定する方法。

1 3. 標的蛋白質は知られていないが生体内での生理活性が知られている3次元構造データベースに格納された1又は2以上の内因性の生理活性化合物を用いて、質問蛋白質のリガンド結合部位の形状及び性質を探索することにより該質問蛋白質の生物学的機能を推定する方法。

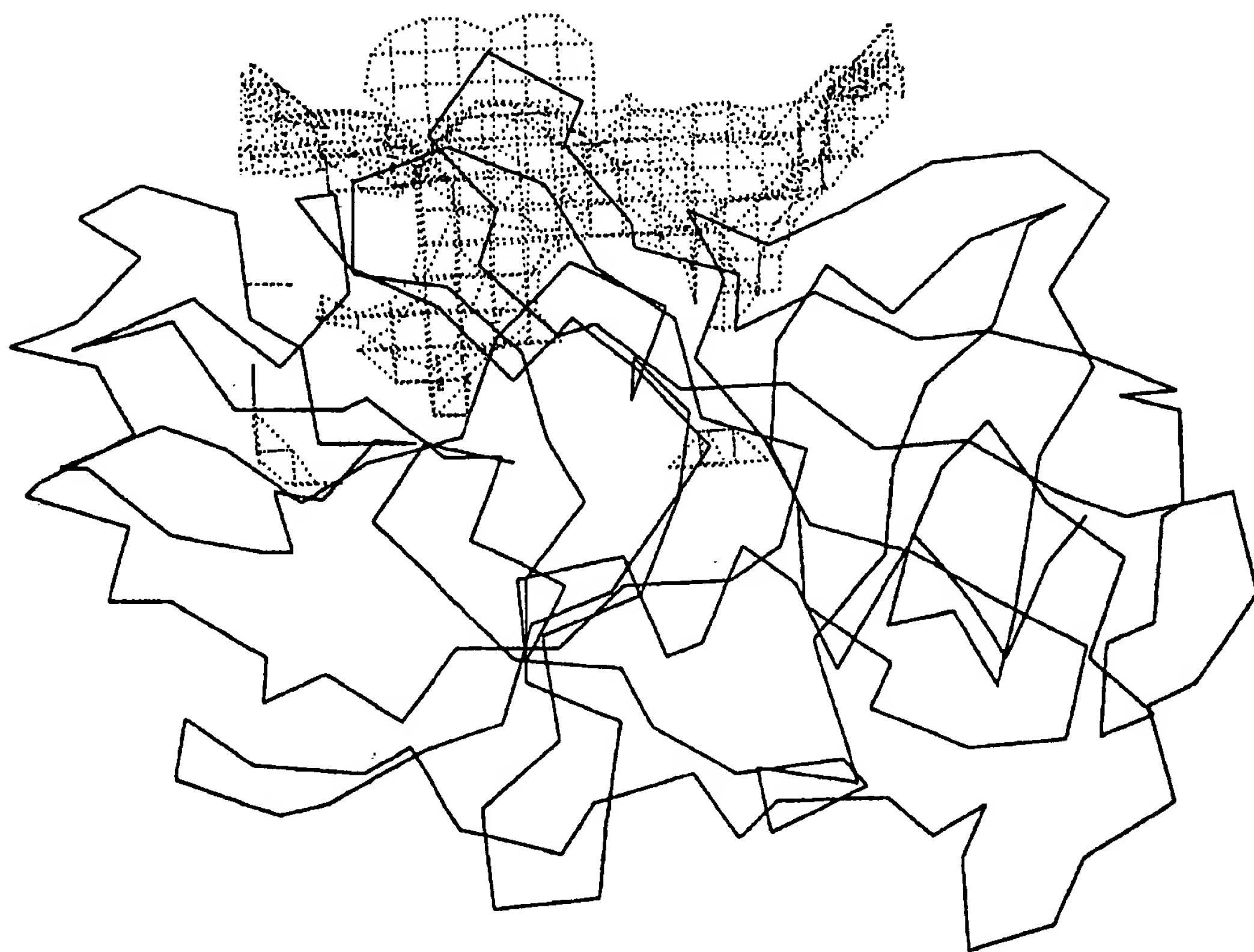
1 4. 標的蛋白質は知られていないが生体内での生理活性が知られている1又は2以上の内因性の生理活性化合物を格納した3次元構造データベースから質問蛋白質のリガンド候補を抽出して該質問蛋白質の生物学的機能を推定する方法。

1 5. 請求項9ないし請求項13のいずれか1項に記載の方法に用いるデータベースであって、標的蛋白質は知られていないが生体内での生理活性が知られている1又は2以上の内因性の生理活性化合物を格納した3次元構造データベース。

WO 99/01409

PCT/JP98/02986

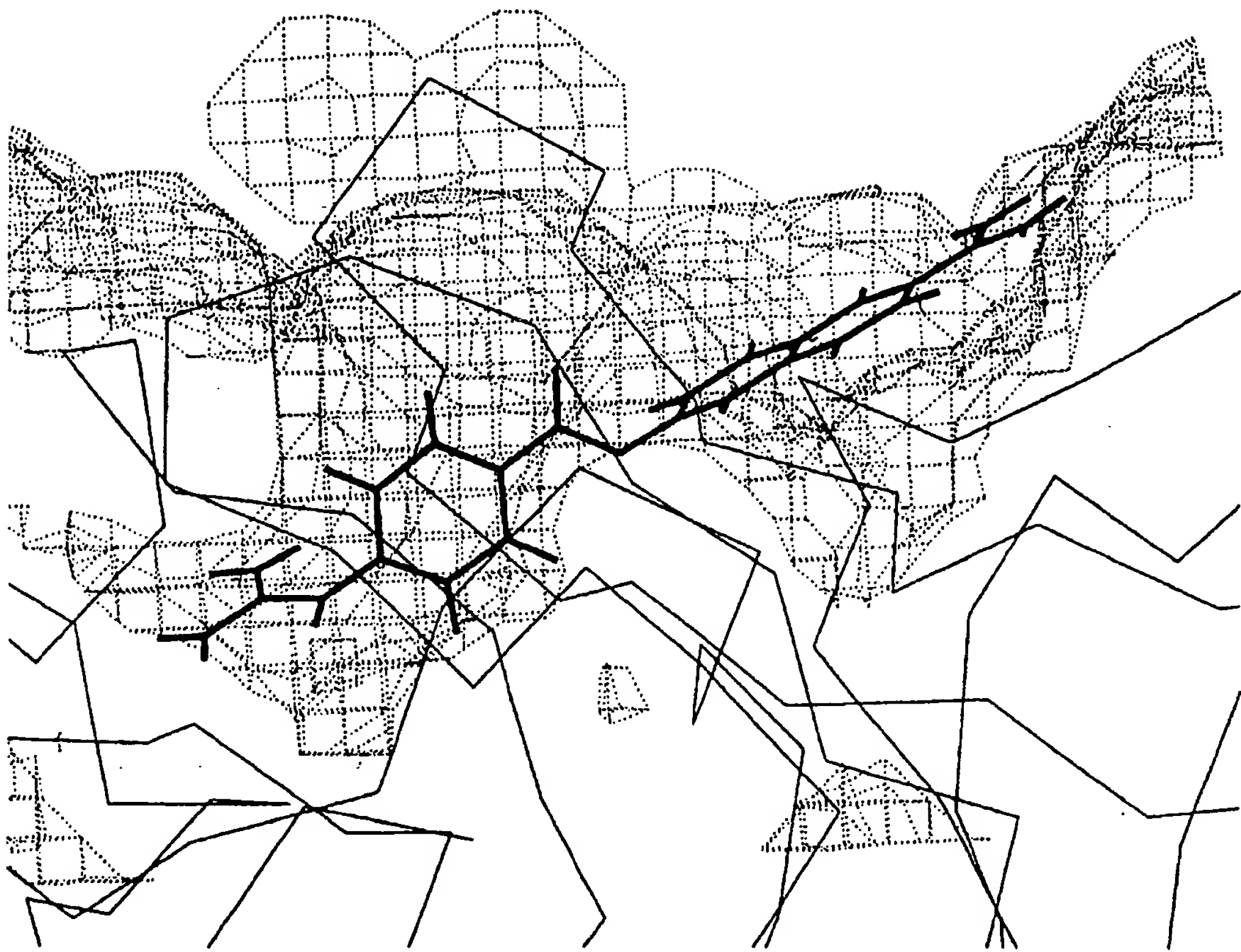
第1図



WO 99/01409

PCT/JP98/02986

第2図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/02986

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C07B61/00, G06F15/40, G06F17/50, G06F17/30, C07K1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C07B61/00, G06F15/40, G06F17/50, G06F17/30, C07K1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS PREVIEWS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	WO, 97/24301, A1 (ITAI, Akiko), 10 July, 1997 (10. 07. 97) & AU, 9711528, B	1-6, 9-14
A	WO, 96/13785, A1 (ITAI, Akiko), 9 May, 1996 (09. 05. 96) & EP, 790567, A1	1-6, 9-14
A	WO, 93/20525, A1 (ITAI, Akiko), 14 October, 1993 (14. 10. 93) & EP, 633534, A1 & US, 5642292, A	1-6, 9-14
A	ITAI, A. et al., "Rational Automatic Search Method for Stable Docking Models of Protein and Ligand", J. Mol. Biol., (1994) 243(2) p.310-326	1-6, 9-14
A	TOMIOKA, N. et al., "GREEN: A Program Package for Docking Studies in Rational Drug Design", J. Computer-Aided Mol. Design, (1994) 8(4) p.347-366	1-6, 9-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

 Date of the actual completion of the international search
 29 September, 1998 (29. 09. 98)

 Date of mailing of the international search report
 13 October, 1998 (13. 10. 98)

 Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/02986

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YAMADA, M. et al., "Development of an Efficient Automated Docking Method", Chem. Pharm. Bull., (1993) 41(6) p.1200-1202	1-6, 9-14
A	YAMADA, M. et al., "Application and Evaluation of the Automated Docking Method", Chem. Pharm. Bull., (1993) 41(6) p.1203-1205	1-6, 9-14
A	JP, 2-200641, A (Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.), 8 August, 1990 (08. 08. 90) (Family: none)	1-6, 9-14
A	KATCHALSKI-KATZIR, E. et al., "Molecular Surface Recognition Determination of Geometric Fit between Proteins and their Ligands by Correlation Techniques", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1992) 89(6) p.2195-2199	1-6, 9-14
A	SCHERZ, M.W. "Synthesis and Structure-Activity Relationships of N,N'-di-o-Tolylguanidine Analogues High-Affinity Ligands for the Haloperidol-Sensitive Sigma Receptor", J. Med. Chem., (1990) 33(9) p.2421-2429	1-6, 9-14
A	NISHIBATA, Y. "Automatic Creation of Drug Candidate Structures Based on Receptor Structure. Starting Point for Artificial Lead Generation", Tetrahedron, (1991) 47(43) p.8985-8990	1-6, 9-14
A	GALLOP, M.A. et al., "Applications of Combinatorial Technologies to Drug Discovery. 1. Background and Peptide Combinatorial Libraries", J. Med. Chem., (1994) 37(9) p.1233-1251	1-6, 9-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/02986

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 7, 8, 15

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 7, 8 and 15 pertain to data bases and are therefore considered mere presentations of information. Thus, they relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/02986

Continuation of Box No. I of continuation of first sheet (1)

Regulations under the PCT, to search.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 98/02986	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁸ C07B61/00, G06F15/40, G06F17/50, G06F17/30, C07K1/00			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁸ C07B61/00, G06F15/40, G06F17/50, G06F17/30, C07K1/00			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に利用した用語) BIOSIS PREVIEWS			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示		関連する 請求の範囲の番号
P, A	WO, 97/24301, A1 (ITAI, Akiko) 10. 7月. 1997 (10. 07. 97) & AU, 9711528, B		1-6, 9-14
A	WO, 96/13785, A1 (ITAI, Akiko) 9. 5月. 1996 (09. 05. 96) & EP, 790567, A1		1-6, 9-14
A	WO, 93/20525, A1 (ITAI, Akiko) 14. 10月. 1993 (14. 10. 93) & EP, 633534, A1 & US, 5642292, A		1-6, 9-14
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 29. 09. 98		国際調査報告の発送日 13.10.98	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号		特許庁審査官 (権限のある職員) 大久保 元浩 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3445	

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 98/02986

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	ITAI, A. et al ' Rational Automatic Search Method for Stable Docking Models of Protein and Ligand ', J. Mol. Biol., (1994) 243(2) p. 310-326	1-6, 9-14
A	TOMIOKA, N. et al. 'GREEN: A Program Package for Docking Studies in Rational Drug Design', J. Computer-Aided Mol. Design, (1994) 8(4) p. 347-366	1-6, 9-14
A	YAMADA, M. et al. 'Development of an Efficient Automated Docking Method', Chem. Pharm. Bull., (1993) 41(6) p. 1200-1202	1-6, 9-14
A	YAMADA, M. et al. 'Application and Evaluation of the Automated Docking Method', Chem. Pharm. Bull., (1993) 41(6) p. 1203-1205	1-6, 9-14
A	JP, 2-200641, A (持田製薬株式会社) 8. 8月. 1990 (08. 08. 90) (ファミリーなし)	1-6, 9-14
A	KATCHALSKI-KATZIR, E et al. 'Molecular Surface Recognition Determination of Geometric Fit between Proteins and their Ligands by Correlation Techniques', Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1992) 89(6) p. 2195-2199	1-6, 9-14
A	SCHERZ, M. W. 'Synthesis and Structure-Activity Relationships of N,N'-di-o-Tolylguanidine Analogues High-Affinity Ligands for the Haloperidol-Sensitive Sigma Receptor', J. Med. Chem., (1990) 33(9) p. 2421-2429	1-6, 9-14
A	NISHIBATA, Y. 'Automatic Creation of Drug Candidate Structures Based on Receptor Structure. Starting Point for Artificial Lead Generation', Tetrahedron, (1991) 47(43) p. 8985-8990	1-6, 9-14
A	GALLOP, M. A. et al. 'Applications of Combinatorial Technologies to Drug Discovery. 1. Background and Peptide Combinatorial Libraries', J. Med. Chem., (1994) 37(9) p. 1233-1251	1-6, 9-14

國際出願番号 PCT/J P 98/02986

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

- 様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(1)) (1992年7月)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.